

LUIZ FERNANDO BERALDO

*Este exemplar foi devidamente corrigido
conforme resolução CCPG/036/83
Piracicaba, 10 fevereiro, 1994
Danilo*

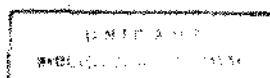
**EFEITO DE DESMINERALIZADORES (TCA E EDTA)
SOBRE PROTEÍNAS E ULTRA-ESTRUTURA DO
PÂNCREAS E DA GLÂNDULA SUBMANDIBULAR
DE CAMUNDONGOS INJETADOS COM ^3H -GLICINA**

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba -
UNICAMP, para obtenção do grau
de MESTRE em Ciências - Área de
Histologia e Embriologia.

PIRACICABA - SP
1993

B45e

21378/BC



LUIZ FERNANDO BERALDO 7/45

Este exemplar foi devidamente corrigido
conforme resolução CCPG/036/83

Piracicaba, 10 de fevereiro 1994

Cassio

**EFEITO DE DESMINERALIZADORES (TCA E EDTA)
SOBRE PROTEÍNAS E ULTRA-ESTRUTURA DO
PÂNCREAS E DA GLÂNDULA SUBMANDIBULAR
DE CAMUNDONGOS INJETADOS COM ³H-GLICINA**

Orientador Prof. Dr. CÁSSIO ODNEI GARCIA, MUNHOZ ~~†~~

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba -
UNICAMP, para obtenção do grau
de MESTRE em Ciências - Área de
Histologia e Embriologia.

PIRACICABA - SP
1993

DEDICO

Aos meus pais, OSWALDO e LYDIA,
que fizeram da vida uma doação
à favor dos filhos.

OFEREÇO

Ao Prof. Dr. CÁSSIO ODNEI GARCIA MUNHOZ

Orientador e amigo, que me iniciou na pesquisa científica, agradeço o incentivo,
a dedicação e a orientação que nortearam a elaboração deste trabalho.

Aos meus irmãos OSWALDO ANTONIO e MARIA CECÍLIA

Pela ajuda e incentivo em todas as fases do meu aprendizado.

A minha noiva JULIANA

Que sempre soube dividir os bons e maus momentos
que marcaram a trajetória deste curso.

AGRADECIMENTOS

À UNICAMP, na pessoa do seu Magnífico Reitor Prof. Dr. CARLOS ALBERTO VOGT, por abrir as portas desta Instituição à pesquisa científica.

À FOP/UNICAMP, na pessoa do seu Diretor Prof. Dr. RENATO ROBERTO BIRAL, por trabalhar incansavelmente para obter e aprimorar as condições para que nossos trabalhos sejam realizados.

Aos Docentes do Departamento de Morfologia, Prof. Dr. MATHIAS VITTI, Prof. Dr. FAUSTO BÉRZIN, Prof. Dr. CARLOS ROBERTO HOPPE FORTINGUERRA, Profa. Dra. HELOÍSA AMÉLIA DE LIMA CASTRO TORETTA, Profa. Dra. TEREZA DE LOURDES SCARPARI BARRICHELO, Prof. Dr. GUILHERME BLUMEN, Prof. Dr. JOSÉ MERZEL, Profa. DARCY DE OLIVEIRA TOSELLO, Profa. SILVANA PEREIRA BARROS, Prof. PEDRO DUARTE NOVAES, que sempre mantiveram abertas todas as portas para que este trabalho pudesse ser concluído.

À profa. DARCY DE OLIVEIRA TOSELLO pelo auxílio na elaboração do Summary.

Ao amigo FRANCISCO CARLOS GROPPPO pelo valioso auxílio técnico na área de computação.

Às Sras IVANI ODAS DEMÉTRIO, MARIA APARECIDA SANTIAGO VARELLA E ELIENE APARECIDA ORSINI NARVAES ROMANI, técnicos da Área de Histologia e Embriologia, pelo auxílio técnico nos procedimentos laboratoriais.

Ao Sr. JOÃO BATISTA LEITE DE CAMPOS, técnico da Área de Anatomia, pelos seus préstimos no tratamento dos animais.

À Sra. SUZETE REGINA TOBLIA NEDER, secretária do Departamento de Morfologia, pela ajuda que sempre prestou quando solicitada.

À Sra. ANA MARIA COSSA DE ARRUDA OLIVEIRA e Sr. PAULO JOSÉ DANELON, secretária e auxiliar da C.P.G., pela ajuda sempre prestimosa.

Ao Prof. Dr. JOSÉ FRANCISCO HÖFLING, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental, pela atenção e prestatividade.

Ao Prof. Dr. MATHIAS VITTI, Coordenador Geral da Pós-Graduação na FOP-UNICAMP, pela maneira séria e acessível com que trata todos os alunos.

Aos AMIGOS Pós-Graduandos, pelo companherismo e prestatividade.

À Profa. JULIANA TARANTO, pela revisão ortográfica deste trabalho.

Perdoem-me aqueles, que, por lápso, deixamos de agradecer. Incluem-se nesta lista.

ÍNDICE

ÍNDICE

	Página
1 - INTRODUÇÃO.....	2
2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	4
3 - RESULTADOS.....	8
4 - DICUSSÃO.....	23
5 - CONCLUSÕES.....	26
6 - RESUMO.....	28
7 - SUMMARY.....	30
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32

1 - INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O estudo microscópico, rotineiro, dos tecidos duros requer que estes passem previamente por um processo de desmineralização. Os ácidos usados para essa finalidade se mostravam, muitas vezes, inadequados quando se pretendia realizar estudos sobre os componentes químicos (THORELL & WILTON, 1945; WISLOCKI & SOGNAES, 1950) ou enzimáticos (LILLIE et al. 1951; SCHAJOWICZ & CABRINI, 1955) contidos em células ou matrizes extracelulares. Assim, vários estudos histoquímicos (SCHAJOWICZ & CABRINI, 1955; MARDEFIN & JAMES, 1957; TROTT, 1961; LILLIE et al. 1951; LILLIE 1962; SCHMIDT, 1963; FERRAZ & MERZEL, 1966) e bioquímicos (TROTT et al., 1962) foram realizados no sentido de se estabelecer um ou mais agentes desmineralizadores que produzissem efeitos secundários menos pronunciados sobre o resíduo orgânico. Entre os vários agentes químicos analisados, o sal sódico do ácido diamino tetra-acético (EDTA) e o ácido tricloroacético (TCA) deram resultados promissores na preservação de carboidratos (glicogênio) e de glicosaminoglicanos.

O EDTA, um agente quelante, também, tem sido amplamente utilizado, por suas virtudes, em estudos morfológicos ultra-estruturais segundo o método preconizado por WARSHAWSKY & MOORE (1967).

O TCA, embora apresente uma grande vantagem sobre o EDTA, uma vez que requer menor tempo para a desmineralização dos tecidos duros, tem sido empregado com menor frequência que o EDTA. Estudos comparativos (TROTT, 1961; LILLIE, 1962; FERRAZ & MERZEL, 1966) entre ele e o EDTA têm apresentado resultados contraditórios, pelo menos no que se refere à preservação de carboidratos (glicogênio e glicosaminoglicanos). Aliás, os resultados histoquímicos obtidos por FERRAZ & MERZEL (1966) revelaram que o TCA a 5% portou-se melhor que o EDTA na preservação de carboidratos. Na literatura, as informações a respeito da ação desses dois desmineralizadores sobre proteínas se restringem a um estudo histoquímico de grupos reativos de aminoácidos (CORREA & BLUMEN, 1974), apresentado em forma de resumo. Nenhuma referência foi encontrada sobre os efeitos desses dois desmineralizadores em proteínas evidenciadas através do método radioautográfico após injeção de aminoácidos precursores radioativos. Este trabalho tem, assim, a finalidade de analisar os efeitos desses dois agentes sobre as proteínas de secreção do pâncreas e da submandibular de camundongos injetados com ^3H -glicina. O mesmo material foi estudado, também, ao nível da microscopia eletrônica, com o objetivo de se comparar a ação dos mesmos sobre a ultra-estrutura daquelas glândulas.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

Três camundongos albinos machos, Swiss, com peso médio de $30g \pm 2$, foram injetados i.p., com 3H -glicina (Amersham International Limited, USA) na dose de $5\mu C/g$ de peso corporal. Uma hora após a injeção, os animais foram sacrificados, sob anestesia com éter etílico, através de perfusão intra-cardíaca com paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,3 M, pH 7,4, por 15 minutos. De cada animal, foram removidas as glândulas submandibulares, o pâncreas e as tíbias. As glândulas foram reduzidas em fragmentos de aproximadamente $1mm^3$, os quais, juntamente com os ossos, foram imersos em glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, a 40 °C, por uma hora e à temperatura ambiente por mais três horas (PERACCHIA & MITTLER, 1972). O material, após lavagem em tampão fosfato (WARSHAWSKY & MOORE, 1967) durante uma noite, foi dividido em três grupos: controle, tratados com EDTA (WARSHAWSKY & MOORE, 1967) e tratados com TCA a 5%; ambas as soluções mantidas a 4 °C e renovadas diariamente. Para cada agente desmineralizador, havia um grupo, constituído pelas tíbias, que recebeu o mesmo tratamento e foi usado para se determinar o tempo que as glândulas permaneceriam nas soluções.

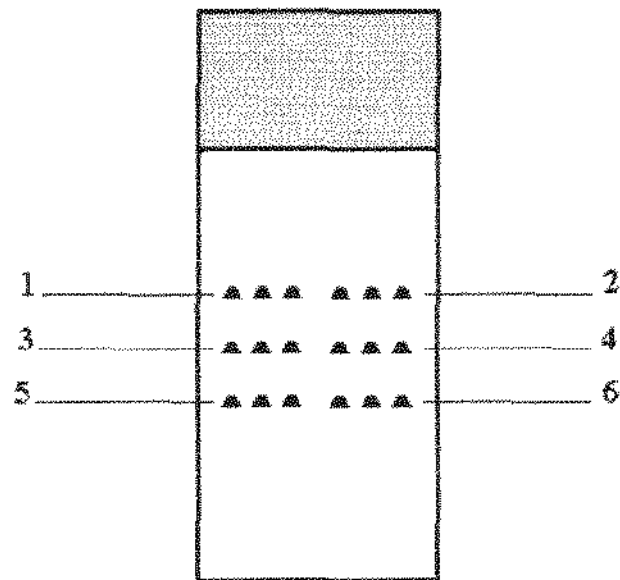
O grupo controle, após a primeira lavagem em tampão, permaneceu no mesmo por mais 48 horas e foi em seguida pós-fixado em tetróxido de ósmio e incluído em Araldite (GLAUERT & GLAUERT, 1958).

O final da desmineralização foi controlada, diariamente, pela dosagem de fosfato (FISKE & SUBBAROW, 1925) em amostras colhidas das soluções das tíbias. A ausência de fosfato nas soluções indicava o final da desmineralização (5 dias para o grupo tratado com TCA e 11 dias para o tratado com EDTA). Por segurança, o material foi deixado por mais 24 horas nos desmineralizadores e, em seguida, lavados em tampão fosfato isotônico (WARSHAWSKY & MOORE, 1967) por 48 horas. Os fragmentos das glândulas tratadas foram pós-fixados em tetróxido de ósmio por 2 horas e incluídos em Araldite, como descrito para o controle.

Cortes com 0,5 μm de espessura, usando-se navalhas de vidro, no ultramicrotomo MT-1 (Sorvall), foram obtidos de dois blocos de cada grupo por animal. Estes cortes foram dispostos na região mediana de uma mesma lâmina de vidro, conforme mostra o Esquema 1.

As lâminas foram cobertas com emulsão radioautográfica K5 da Ilford pelo método do "dipping" (KOPRIVA & LEBLOND, 1962), as quais, após um período de exposição determinado por lâminas extras que serviram de teste, foram reveladas em D-19 B da Kodak, fixadas em hipossulfito de sódio à 24%, e os cortes corados com azul de metilino à 1% em borato de sódio a 1%.

Esquema 1 - Esquema representativo da distribuição dos cortes nas lâminas, para serem cobertos com emulsão radioautográfica.



1 e 6 - Cortes de tecidos do grupo controle.

2 e 5 - Cortes de tecidos do grupo tratado com EDTA.

3 e 4 - Cortes de tecidos do grupo tratado com TCA.

Obs. - Em cada lâmina, estavam dispostos apenas cortes referentes a um mesmo animal, sendo que foram cortados dois blocos por grupo de cada animal.

A análise quantitativa, representada pela contagem de grãos de prata reduzida (AgBr), localizados sobre a região apical das células dos ácinos glandulares, foi realizada em 200 campos de $81 \mu\text{m}^2$, utilizando-se uma ocular Zeiss Kbl 8x e objetiva de 100x em óleo de imersão.

Os mesmos blocos, previamente cortados com $0,5 \mu\text{m}$, foram reaparados e cortados com 60 - 100 nm de espessura, no ultra-micrótomo MT-2C (RMC). Estes, foram coletados em telas de cobre com 300 grades, contrastados com citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963) e acetato de uranila (solução saturada em álcool 50%), analisados e fotografados em Microscópio Eletrônico de Transmissão EM 10 da Zeiss.

3 - RESULTADOS

RESULTADOS

1 - Análise radioautográfica quantitativa das unidades secretoras serosas do pâncreas e da glândula submandibular.

1.1 - Pâncreas

No pâncreas, observou-se uma reação radioautográfica intensa, uma hora após a injeção da glicina marcada, exclusivamente no produto de secreção localizado no ápice das unidades acinosas (Figs. 1, 2 e 3). Os tratamentos com as soluções desmineralizadoras (EDTA e ATC) não alteraram a distribuição qualitativa da reação (Figs. 1, 2 e 3). As contagens dos grãos de AgBr sobre a secreção, tanto nos controles como nos tratados, estão condensados na tabela 1. A análise de variância desses dados (tabela 2) mostra que não existem diferenças significantes entre o grupo controle e os grupos tratados.

1.2 - Submandibular

As reações radioautográficas observadas na glândula submandibular 1 hora após a injeção, foi mais forte no produto de secreção das unidades secretoras seromucosas (figs. 4, 5 e 6) do que nos ductos granulosos. Assim, as contagens de grãos de AgBr feitas nos controles e nos tratados restringiu-se ao produto de secreção das unidades seromucosas. Nesta glândula, por razões de ordem técnica (perda de um animal), as contagens dos grãos sobre o produto de secreção das unidades seromucosas foram realizadas apenas nas glândulas de dois animais. Os dados obtidos e apresentados na tabela 3, mostraram, após a análise de variância (tabela 4), que não há diferenças significantes nas reações radioautográficas entre os três grupos.

As figuras 1 a 3 são fotomicrografias de radioautogramas de cortes, com 0,5 μm de espessura, de pâncreas de camundongos injetados com ^3H -glicina e corados com azul de metileno a 1% em borato de sódio a 1%.

Fig. 1 - Pâncreas - Controle.

Nessa figura, nota-se que a reação radioautográfica (pontos negros) está localizada na porção apical dos ácinos serosos (as), que aparecem como áreas mais claras. A porção basal das células acinosas, rica em retículo endoplasmático granular, aparece corada em cinza (azul no original); $\sim 640 \text{ X}$.

Fig. 2 - Pâncreas - TCA.

A reação radioautográfica aparece, como na figura precedente, restrita à porção apical das células. Nota-se que a coloração cinza é mais escura e difusa que na figura 1, assumindo um aspecto "borrado". À esquerda da figura, os limites entre os ácinos (as) não estão bem definidos ; $\sim 640 \text{ X}$.

Fig 3 - Pâncreas - EDTA.

Os aspectos estruturais e a coloração dos ácinos (as), nesta figura, é bem semelhante a do controle. A reação radioautográfica, como nas figuras precedentes, está localizada na porção apical das células; $\sim 640 \text{ X}$.

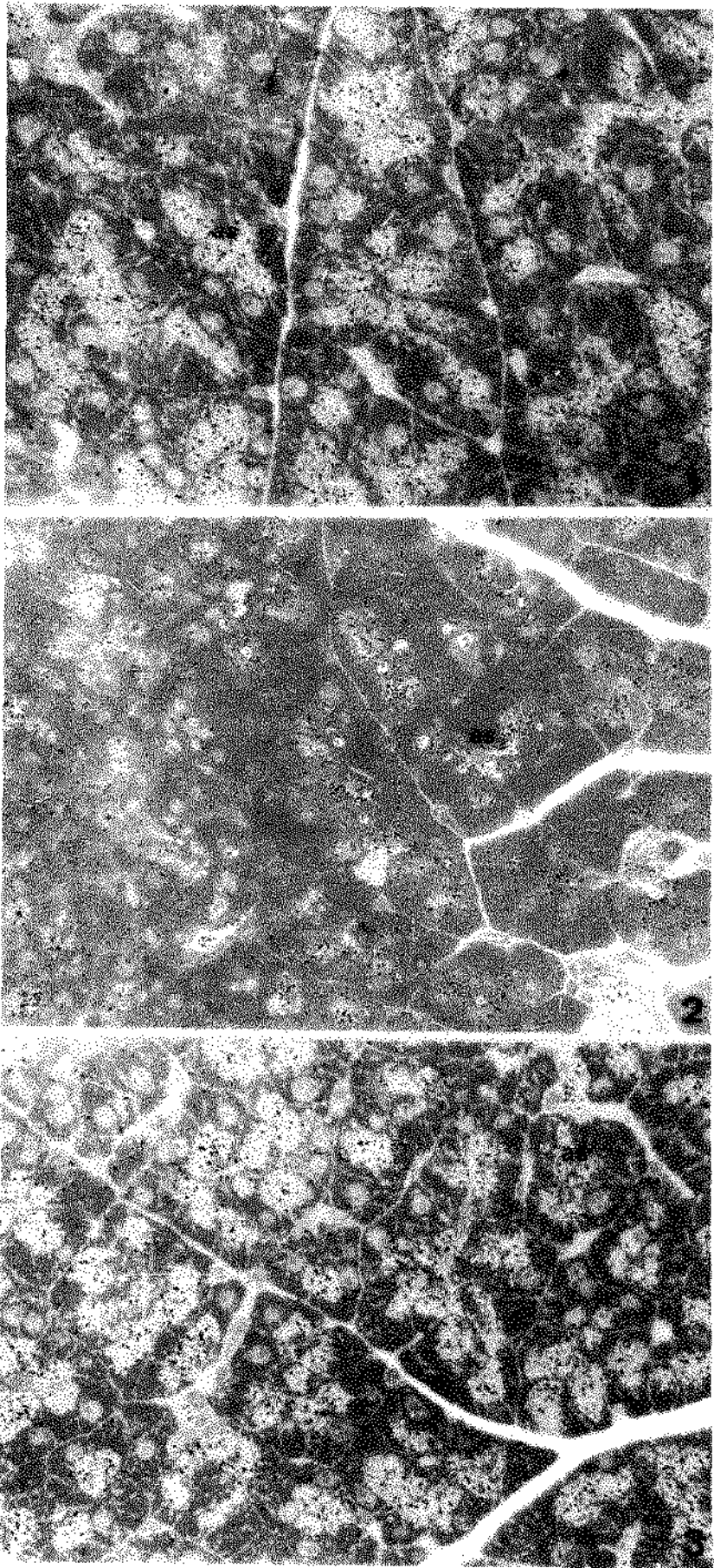


Tabela 1- Concentração de grãos de AgBr sobre a secreção dos ácinos serosos do pâncreas: Controles e Tratados com EDTA e TCA (descontado o background).

ANIMAL	CONTROLE	TRATADOS COM EDTA	TRATADOS COM TCA
1	5.934,25	5.391,75	5.747,00
2	3.605,00	5.771,50	4.313,75
3	4.584,50	5.053,50	4.649,50
TOTAL	14.123,75	16.216,75	14.710,25
MÉDIA	4.707,91	5.405,58	4.903,41

Tabela 2 - Análise de variância dos dados dispostos na tabela 1. O resultado de $F = 0,56$ indica que os resultados, à nível de 5%, não são significantes.

CAUSAS DE VARIAÇÕES	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	2	777.130,36	388.565,18	0.56
RESÍDUO	6	4.117.412,62	686.235,43	
TOTAL	8	4.894.542,98		

As figuras 4 a 6 são fotomicrografias de radioautogramas de cortes com 0,5 μ m de espessura da glândula submandibular de camundongos injetados com ^3H -glicina, corados com azul de metileno a 1% em borato de sódio a 1%.

Fig. 4 - Glândula submandibular - Controle.

A reação radioautográfica (pontos negros) localiza-se sobre a secreção das unidades secretoras seromucosas (asm). A coloração cinza (azul no original) com azul de metileno aparece restrita à periferia da porção basal das células. Artefatos sob a forma de vacúolos (v) aparecem no interior das células. dg = ducto granuloso; de = ducto estriado; ~ 640 X.

Fig. 5 - Glândula submandibular - TCA.

A coloração com azul de metileno apresenta-se mais atenuada na periferia das células acinosas, quando comparadas com o controle. A reação radioautográfica apresenta a mesma localização observada no controle. asm = ácinos seromucosos; dg = ducto granuloso; v = vacúolos; ~ 640 X.

Fig. 6 - Glândula submandibular - EDTA.

A secreção seromucosa aparece mais intensamente corada do que no controle, enquanto a periferia da porção basal mostra-se mais clara. Não há modificações na localização da reação radioautográfica. asm = ácino seromucoso; dg = ducto granuloso; ~ 640X.

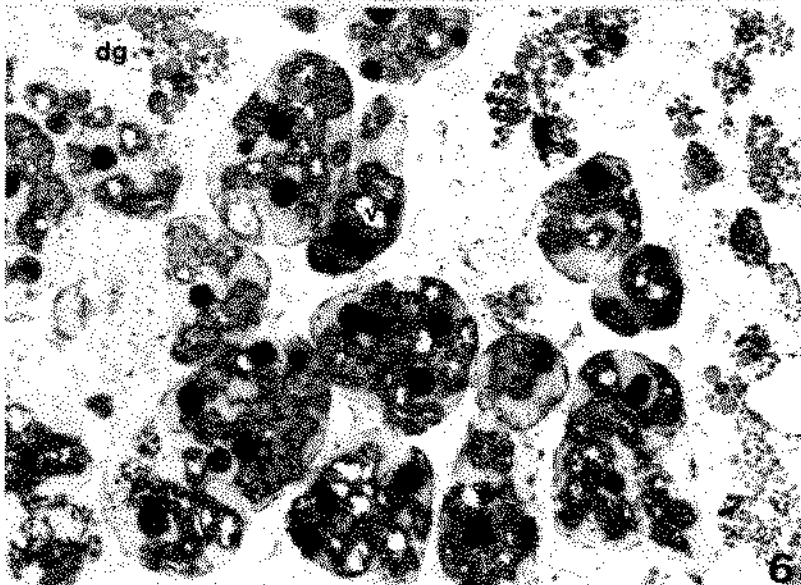
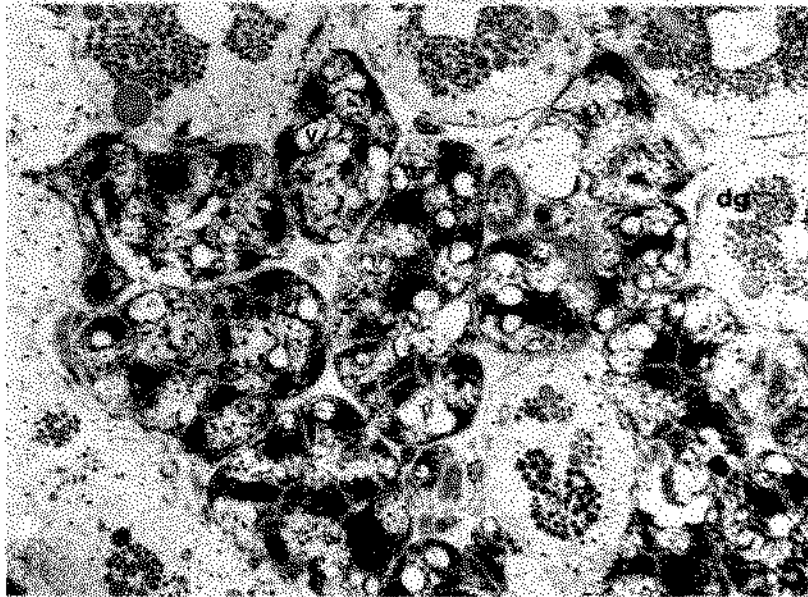
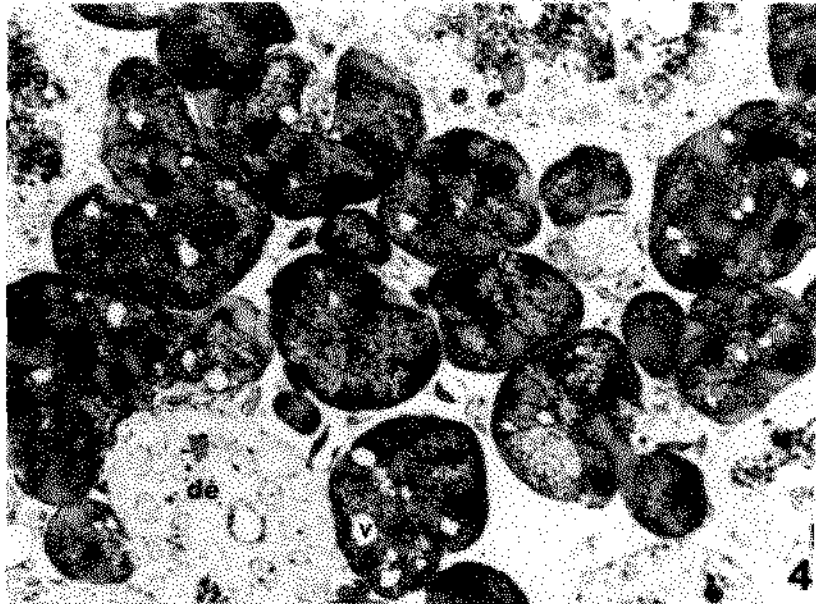


Tabela 3 - Concentração de grãos de AgBr sobre a secreção seromucosa da glândula submandibular: Controles e Tratados com EDTA e TCA(descontado o background).

ANIMAL	CONTROLE	TRATADOS COM EDTA	TRATADOS COM TCA
1	1.350,00	1.224,50	1.176,00
2	1.357,50	1.393,00	1.446,50
TOTAL	2.707,50	2.617,50	2.622,50
MÉDIA	1.353,75	1.308,75	1.311,25

Tabela 4 - Análise de variância dos dados dispostos na tabela 3. O resultado de $F = 0,075$ indica que os resultados, à nível de 5%, não são significantes.

CAUSAS DE VARIAÇÕES	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	2	2.558,33	1.279,16	0,075
RESÍDUO	3	50.809,38	16.936,46	
TOTAL	5	53.367,71		

2 - Ultra-estrutura do pâncreas e da glândula submandibular sem e com tratamento pelos agentes desmineralizadores.

2.1. Pâncreas :

No grupo controle, as células serosas dos ácinos pancreáticos (figs. 7 e 8) apresentaram todas as características ultra-estruturais que são peculiares às células secretoras de proteínas. No terço basal, localiza-se o núcleo esférico ou ovóide, vesiculoso contendo de 1 a 2 nucléolos. A cromatina nuclear apresenta-se sob a forma de filamentos delgados dispersos pelo suco nuclear. A região infranuclear e lateral do núcleo (fig. 8) mostra uma grande riqueza de cisternas do retículo endoplasmático granular. Mitocôndrias longas ou ovóides e com cristas bem definidas são encontradas dispersas pelo citosol, entremeadas com o retículo endoplasmático rugoso. O terço apical da célula pancreática exibe numerosos grânulos de secreção (grânulos de zimogênio), esféricos e com diâmetro e elétrons de densidade variáveis (fig. 8). Os espaços intercelulares são bastante estreitos, em virtude da presença de pequena quantidade de substância intercelular (glicocalix) interposta. A presença de desmossomos é observada entre os limites intercelulares, notadamente nas proximidades do lúmen acinar.

Os fragmentos pancreáticos submetidos à ação do TCA exibiram algumas alterações ultra-estruturais evidentes. As cisternas do retículo endoplasmático mostram-se, em certas áreas, bem mais dilatadas do que nos controles, enquanto que a matriz das mitocôndrias aparece densa e as cristas mal definidas. O conteúdo nuclear apresenta aspecto homogêneo e mais elétron denso do que no controle. Os filamentos de eucromatina, em muitas células, não estão bem evidentes (fig. 9). Na heterocromatina as alterações são menos evidentes, embora ela se apresente com aspecto mais denso do que nos controles. Os nucléolos assumem também aspecto homogêneo e perdem o granulado característico. Alterações nítidas são apreciadas nos espaços intercelulares que aparecem amplamente separados (fig. 12).

Os fragmentos do pâncreas tratados pelo EDTA não mostraram diferenças ultra-estruturais significantes em relação ao grupo controle (comparem-se as figs. 11 e 12 com as figs. 7 e 8)

2.2. Glândula Submandibular :

As glândulas submandibulares de alguns roedores, entre eles o camundongo, diferem das da maioria dos mamíferos por apresentarem, além das unidades secretoras, do sistema de ductos (intercalares, estriados, interlobulares), comum à maioria das glândulas salivares, um outro tipo de ducto com células ricas em grânulos e, por isso, denominados ductos granulados. Na

As figuras 7 a 12 são micrografias eletrônicas de cortes de pâncreas de camundongos injetados com ^3H -glicina, contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo.

Figs. 7 e 8 - Células acinosas do pâncreas - Controle.

Fig. 7 - Região supranuclear de uma célula pancreática apresentando cisternas do retículo endoplasmático granular (REG) moderadamente dilatadas. As mitocôndrias (m) em corte tangencial ou transversal estão entremeadas com as cisternas do retículo; $\sim 10.500 \text{ X}$.

Fig. 8 - Região perinuclear de uma célula acinosa mostrando o núcleo (N) com a heterocromatina agregada à carioteca. A eucromatina aparece como pontos escuros dispersos no conteúdo nuclear. O aspecto granular do nucléolo (nc) é bem evidente. As cisternas do retículo endoplasmático granular (REG) aparecem bastante achatadas nessa célula. gs = grânulo de secreção; $\sim 10.000 \text{ X}$.

Figs. 9 e 10 - Células acinosas do pâncreas - TCA.

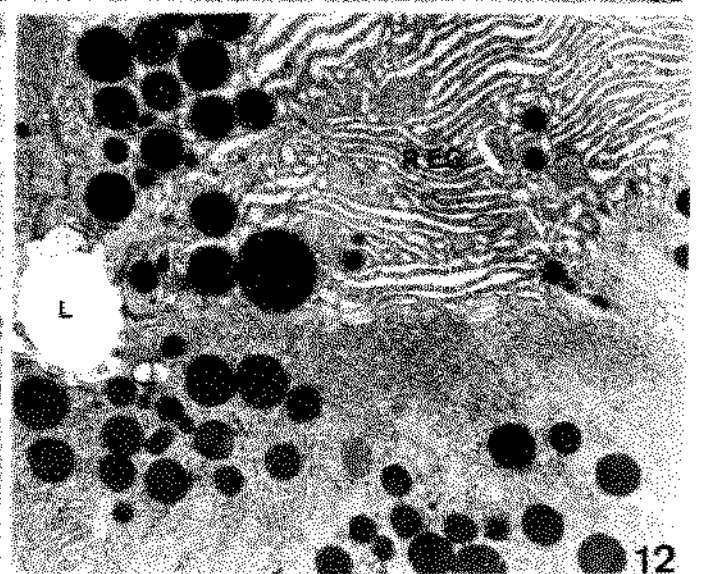
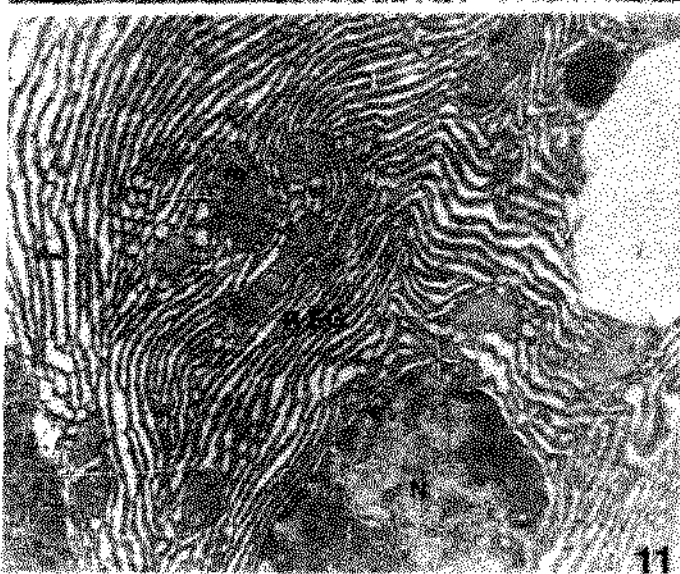
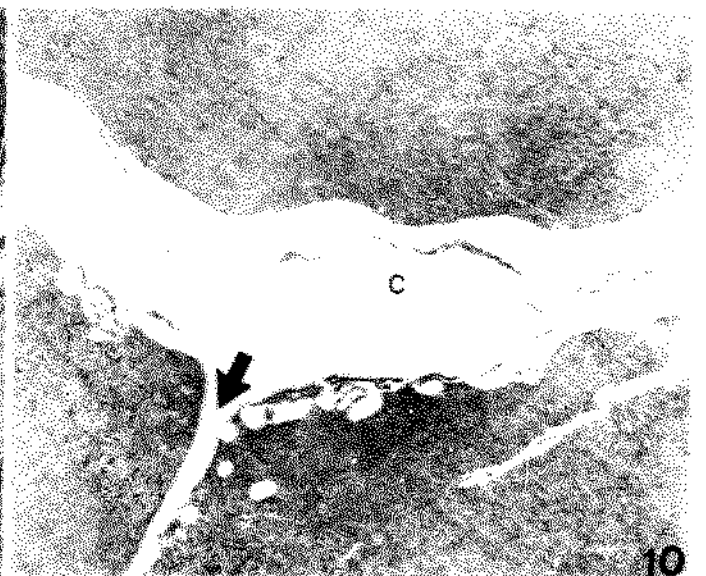
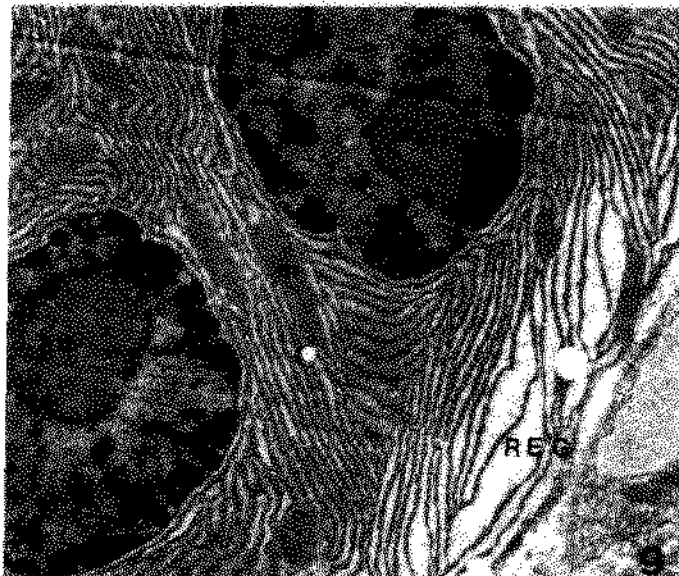
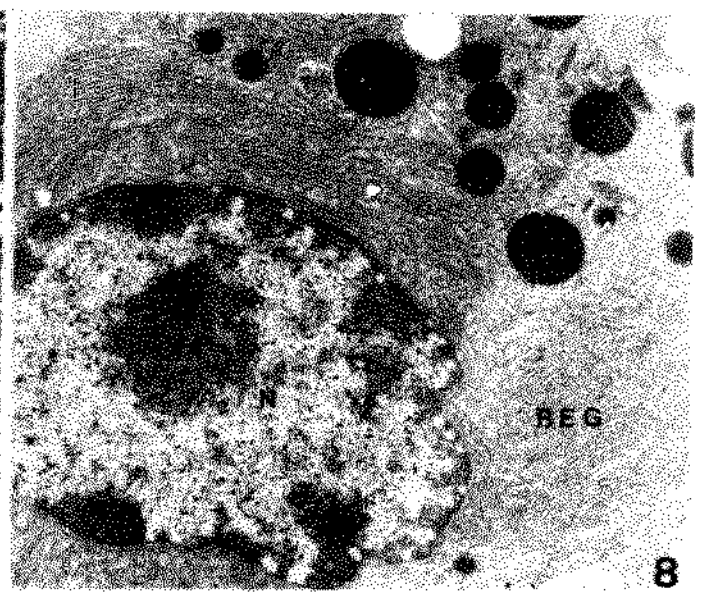
Fig. 9 - Região perinuclear de duas células pancreáticas exibindo, na periferia da base celular, cisternas do retículo endoplasmático granular (REG) anormalmente dilatadas. Mitocôndrias (m) são visualizadas entremeadas às cisternas. A heterocromatina, com aspecto mais denso do que no controle, está associada à carioteca. O conteúdo nuclear (suco nuclear) mostra-se mais denso e homogêneo do que no controle, enquanto a eucromatina perde o seu aspecto pontilhado. Aspecto similar é observado no conteúdo nucleolar (nc); $\sim 10.000 \text{ X}$.

Fig. 10 - Região basal entre duas células acinosas mostrando o marcado alargamento do espaço intercelular (seta). C = conjuntivo; $\sim 10.000 \text{ X}$.

Figs. 11 e 12 - Células acinosas do pâncreas - EDTA.

Fig. 11 - Região perinuclear de uma célula acinosa mostrando cisternas do retículo endoplasmático granular (REG) e mitocôndrias (m). A cromatina nuclear e o conteúdo do núcleo (N) aparece pouco mais denso que o do controle; $\sim 10.000 \text{ X}$.

Fig. 12 - Região apical de duas células acinosas. A porção da célula na parte superior da figura mostra cisternas do retículo endoplasmático granular (REG) ligeiramente mais dilatadas do que as da parte inferior. gs = grânulo de secreção; L = luz acinar; $\sim 10.000 \text{ X}$.



submandibular do camundongo, as unidades secretoras têm a forma de ácinos cujas células elaboram produtos de natureza protéica e glicídica associadas e, por isso, denominadas células seromucosas. Estas células, nos fragmentos glandulares controle contém, no seu terço basal, um núcleo único, ovóide e de contorno, às vezes, irregular, com filamentos de eucromatina dispersos pelo suco nuclear e a heterocromatina condensada na sua periferia. Os nucléolos, em número de 1 a 2 são vistos dispersos, aleatoriamente, pelo interior do núcleo. O citosol da região infranuclear e lateral do núcleo mostra grande quantidade de cisternas achatadas do R.E.G.. Mitocôndrias, pouco numerosas, de forma esférica ou alongadas, são encontradas no citosol da região basal. No pólo apical das células seromucosas, observa-se numerosos glóbulos de forma variável, esféricos, quando isolados ou irregulares, quando coalescidos. Estes glóbulos (à direita da fig. 13), na sua maioria, são elétron-luscentes e estão envolvidos por membrana que separa o conteúdo do glóbulo, de aparência flocular, do citosol.

Os ductos estriados (fig. 13 à esquerda), por sua vez, são revestidos por células epiteliais que mostram, no seu terço basal, além do núcleo esférico e vesiculoso, invaginações pronunciadas da membrana celular que dividem o citosol basilar em compartimentos que alojam mitocôndrias com o seu longo eixo paralelo ao eixo longitudinal da célula. Ao lado das mitocôndrias, observa-se, também, cisternas do R.E.G. correndo paralelas ao longo eixo das mitocôndrias. Na porção apical das células não se visualizam grânulos de secreção, enquanto que vários desmossomos foram observados ao longo dos limites intercelulares.

Os ductos granuloso são revestidos por células que apresentam, no seu terço basal, núcleo ovóide e de aspecto vesiculoso. Na porção infranuclear e lateral do núcleo, visualizam-se cisternas achatadas ou dilatadas do R.E.G., contendo material filamentoso de aspecto flocular. Sáculos do aparelho de Golgi são observados na região supranuclear. Mitocôndrias esféricas ou alongadas, com cristas bem evidentes, aparecem distribuídas por todo o citosol. A porção apical das células mostra uma grande quantidade de grânulos de secreção, de tamanho e elétron densidade variáveis.

Os fragmentos glandulares tratados pelo TCA exibem modificações ultra-estruturais semelhantes ou mais pronunciadas que àquelas observadas no pâncreas. As cisternas do R.E.G. aparecem mais dilatadas e, muitas vezes, com ruptura das membranas envoltórias (fig. 16). Os núcleos, às vezes, aparecem mais claros (fig. 15) que os do grupo controle. Os espaços intercelulares tornam-se mais amplos, com maior separação das células. A eucromatina aparece dispersa heterogeneamente e com rarefação do conteúdo nuclear.

As mitocôndrias e os glóbulos de secreção, embora corados mais densamente do que nos controles, não apresentam maiores alterações estruturais.

O citosol, em algumas células, (fig. 15 e 16) torna-se mais rarefeito do que o controle, apresentando, ainda, massas densas entremeadas com áreas mais claras.

O tratamento dos fragmentos da submandibular tratadas pelo EDTA, da mesma forma como ocorre com o pâncreas, não mostra alterações significantes na ultra-estrutura dos componentes citoplasmáticos ou nucleares das células seromucosas, dos ductos estriados e granulosos (comparem-se as figs. 17 e 18 com as figs. 13 e 14).

As figuras 13 a 18 são micrografias eletrônicas de cortes de glândula submandibular de camundongos injetados com ^3H -glicina, contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo.

Figs. 13 e 14 - Partes de células de um ducto estriado, de um ácino seromucoso e de um ducto granuloso de glândula submandibular - Controle.

Fig. 13 - À esquerda da figura aparece a região basal de uma célula pertencente a um ducto estriado, mostrando as mitocôndrias (m) paralelas ao longo eixo da célula. Na região supranuclear, observa-se sáculos do aparelho de Golgi (G). O núcleo (N) apresenta a eucromatina (pontos escuros) dispersa no conteúdo nuclear. À direita da figura visualiza-se a porção periférica de um ácino seromucoso mostrando mitocôndrias perpendiculares ao longo eixo da célula e glóbulos de secreção (gls); ~ 10.000 X.

Fig. 14 - Parte da região perinuclear de uma célula de um ducto granuloso mostrando o núcleo (N), mitocôndrias (m) e sáculos do aparelho de Golgi (G); ~ 15.000X.

Figs. 15 e 16 - Célula de um ducto estriado e de um ácino seromucoso - TCA

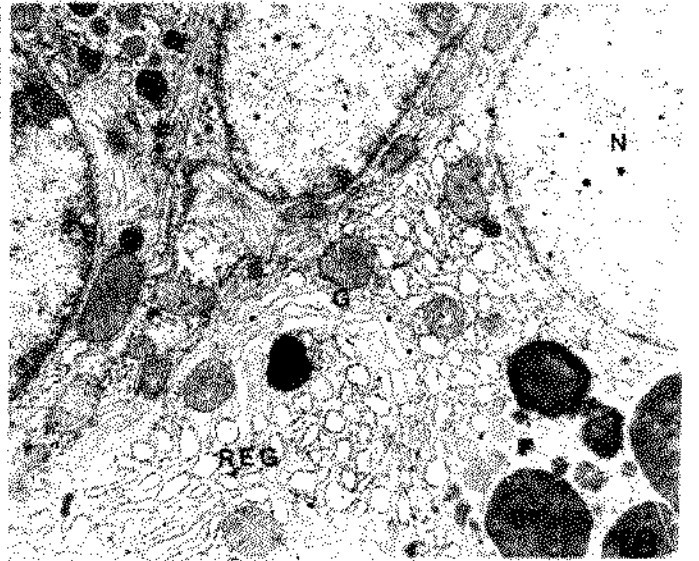
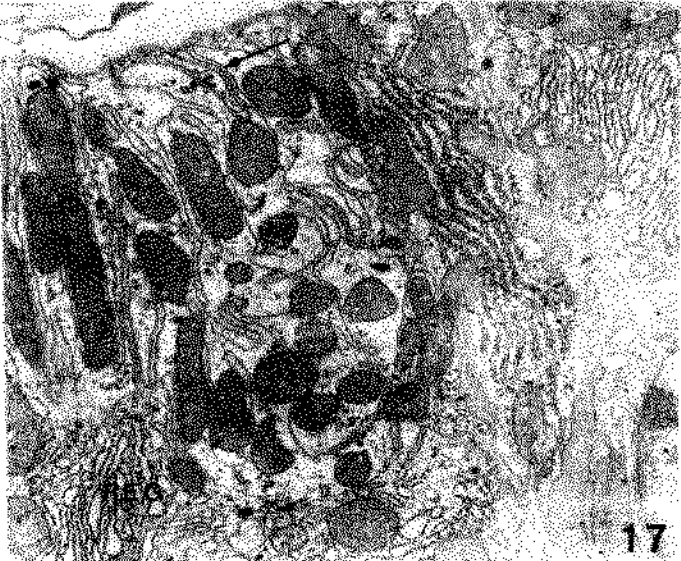
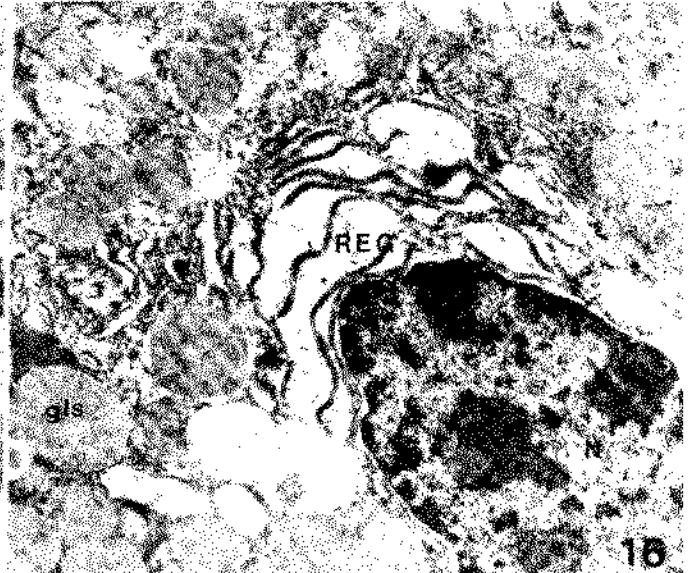
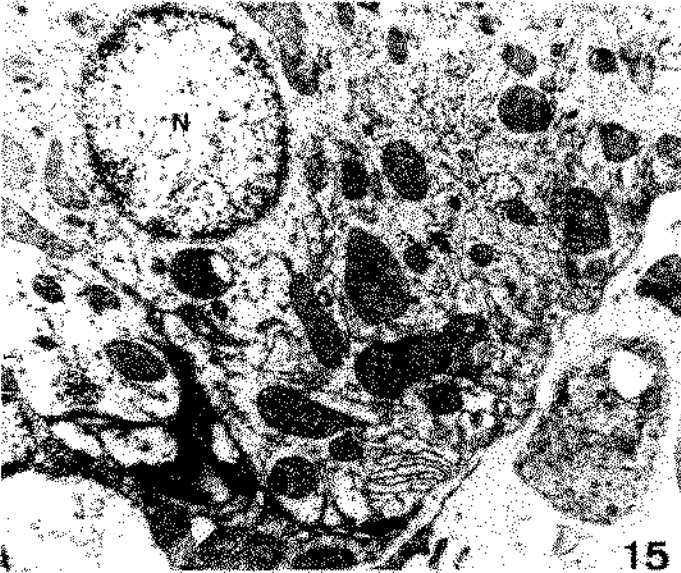
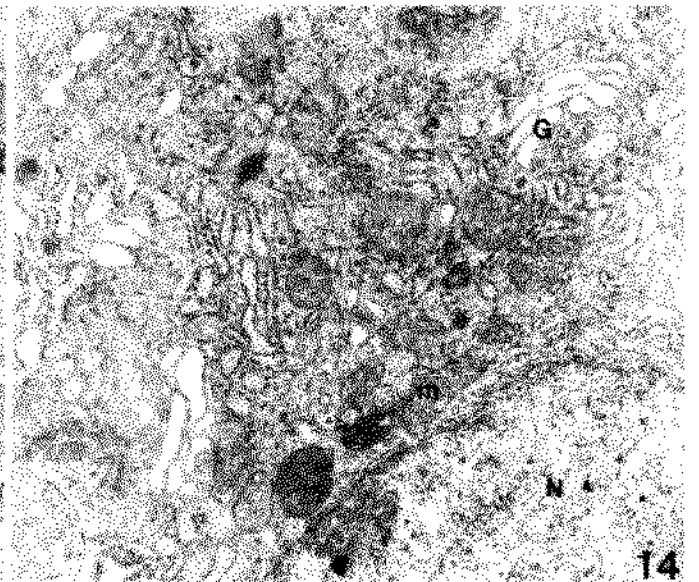
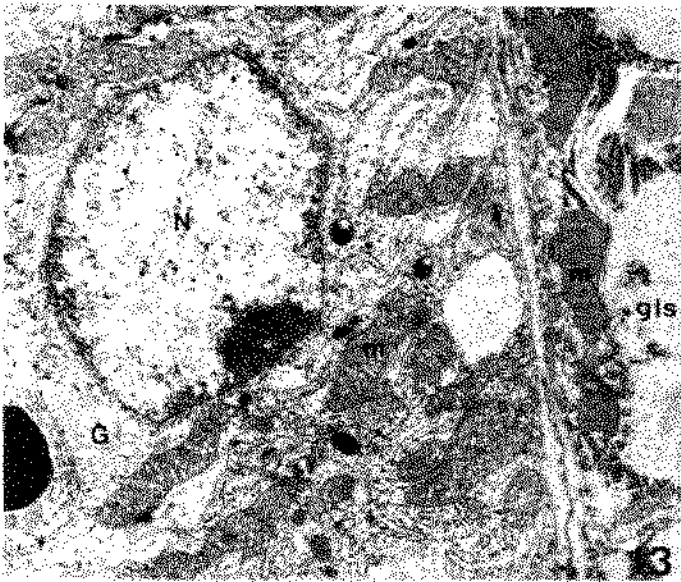
Fig. 15 - Parte da porção basal de uma célula de um ducto estriado mostrando mitocôndrias (m) com características estruturais normais, enquanto o citosol perinuclear e o conteúdo do núcleo (N) aparecem com aspecto rarefeito; ~ 10.000 X.

Fig. 16 - Região perinuclear de uma célula seromucosa mostrando desorganização celular. As cisternas do retículo endoplasmático granular (REG) estão anormalmente dilatadas, vazias e com suas membranas rompidas. No citosol, há condensações formando massas separadas por áreas claras. Os glóbulos de secreção (gls), embora mais densos do que no controle, não apresentam maiores alterações, o mesmo ocorrendo com o núcleo e o nucléolo (nc); ~ 10.000 X.

Figs. 17 e 18 - Células de um ducto estriado e de um ducto granuloso - EDTA

Fig. 17 - Região basal de uma célula de um ducto estriado mostrando invaginações da membrana plasmática (seta) dividindo o citosol em lojas contendo mitocôndrias (m). REG = retículo endoplasmático rugoso; G = Golgi; ~ 10.000 X.

Fig 18 - Parte de três células de um ducto granuloso mostrando características ultra-estruturais indistintas do controle. G = Golgi; N = núcleo; REG = retículo endoplasmático rugoso; ~ 10.000 X.



4 - DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

A comparação entre os resultados radioautográficos quantitativos, observados no pâncreas e na glândula submandibular de camundongos dos grupos controle e dos tratados pelo EDTA tamponado e pelo TCA a 5%, revelou que essas soluções desmineralizadoras não produziram extrações ou translocações dos componentes protéicos marcados pela ^3H -glicina, contidos na secreção das células serosas e seromucosas dessa glândulas.

Não obstante, a similaridade dos resultados e o fato de que o TCA tem a vantagem de remover os sais minerais num intervalo de tempo mais curto do que o EDTA, seus efeitos adversos, observados notadamente durante os procedimentos técnicos, foram superiores às suas qualidades. Assim, a obtenção de cortes semi-finos nos fragmentos por ele tratados foi uma tarefa muito difícil e com maior dispêndio de tempo do que com o material tratado pelo EDTA. Além disso, a coloração difusa e "borrada", observada principalmente nas células pancreáticas, sugere que o TCA produziu algum tipo de alteração nas qualidades corantes dessas células.

Por outro lado, os resultados observados ao M.E. mostraram que o TCA, além de produzir as alterações morfológicas ultra-estruturais descritas, deve ter provocado também, alterações em certos componentes orgânicos das células. Assim, a homogenização e perda de aspecto granular visualizados nas células acinosas do pâncreas, bem como a rarefação do conteúdo nuclear e do citosol de algumas células da glândula submandibular, sugerem uma possível extração dos ácidos nucleicos e de proteínas citoplasmáticas. A possibilidade de que a fixação dessas células tenha sido insatisfatória, daí a possível extração do material nuclear ou citoplasmático, parece pouco provável, uma vez que as mitocôndrias, que são organelas muito sensíveis aos efeitos da má fixação, aparecem bem preservadas nos fragmentos tratados pelo TCA.

A ação lesiva dos ácidos fortes sobre os ácidos nucléicos tem sido reportada na literatura. LILLIE (1944), estudando os efeitos do pH sobre a coloração da medula óssea, utilizando misturas tamponadas de ácido sulfúrico e ácido fórmico pH 1,15 - pH 1,30 durante uma hora, observou que este tratamento destruía a basofilia da cromatina nuclear. Ainda LILLIE et al. (1951) sugeriram que os ácidos fortes podem dissolver, hidrolisar ou desnaturar os complexos nucleotídeos do ácido fosfórico da ribose e desoxiribose. Resultados sugestivos de extração de ácidos nucléicos pelo ácido nítrico a 5% foram observados por MARDFIN & JONES (1957) nos neurônios de cerebelo de ratos. Essas células não se coraram pela Tionina, Azur "B" ou pela reação Feulgen-Schiff quando previamente tratadas pela solução ácida. O TCA, além de efeitos lesivos sobre a ultra-estrutura celular, e de possível extração dos ácidos nucleicos, apresentou

outros efeitos negativos. A obtenção de cortes ultra-finos (60 - 100 nm) de boa qualidade foi extremamente difícil de se conseguir nos fragmentos do pâncreas e da glândula submandibular.

O EDTA, conforme era a expectativa, não alterou significativamente a arquitetura ultra-estrutural do material aqui estudado, confirmando, assim, suas qualidades previamente reportadas por WARSHAWSKY & MOORE (1967).

As observações realizadas neste trabalho, ao nível da microscopia óptica e eletrônica, sugerem que o EDTA empregado segundo o método preconizado por WARSHAWSKY & MOORE (1967), deva ser indicado como solução desmineralizadora de tecidos duros para estudos que se utilizem de cortes semi-finos em microscopia óptica ou ultra-finos em microscopia eletrônica.

5 - CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

A análise dos resultados radioautográficos e ultra-estruturais permite-nos concluir que:

1 - O tratamento com os agentes desmineralizadores utilizados não provoca alterações na preservação das proteínas marcadas com ^3H -glicina contidas nas secreções das células acinosas do pâncreas e seromucosas da submandibular de camundongos.

2 - O TCA causou alterações indesejáveis na ultra-estrutura das células do pâncreas e da glândula submandibular do camundongo.

3 - O EDTA não causou alterações significantes na ultra-estrutura do pâncreas e da glândula submandibular de camundongos.

6 - RESUMO

RESUMO

Neste estudo, procurou-se, através do método radioautográfico, observar os efeitos do EDTA a 4,13% e do TCA a 5% sobre as proteínas contidas nas secreções das células acinosas do pâncreas, nas células seromucosas da glândula submandibular e sobre a ultra-estrutura dessas glândulas de camundongos injetados com uma única dose de ^3H -glicina e sacrificados uma hora após a injeção. As glândulas de cada animal foram divididas em pequenos fragmentos e estes, separados em 3 grupos: controles (não tratados), tratados pelo TCA e tratados com EDTA. As reações radioautográficas foram quantificadas mediante a contagem de grãos de prata reduzida sobre a secreção localizada na porção apical das células pancreáticas e sobre a secreção das células seromucosas da glândula submandibular.

Os dados obtidos após as contagens dos grãos de prata mostraram, após a análise de variância, que não há diferenças significantes entre os três grupos. Conclui-se, assim, que tanto o TCA como o EDTA não provocam extrações de proteínas marcadas nas secreções. O TCA tem sobre o EDTA a vantagem de remover os sais minerais num intervalo de tempo mais curto, porém, a obtenção dos cortes semi-finos no material tratado por ele é bem mais difícil. Ao microscópio eletrônico, o material tratado pelo EDTA apresenta o mesmo aspecto do controle. O TCA, ao contrário, provocou muitas alterações da ultra-estrutura de vários componentes celulares. Ao contrário do EDTA, seu uso como agente desmineralizador de tecidos duros em estudos ultra-estruturais não deve ser recomendado.

7 - SUMMARY

SUMMARY

The aim of this study was to observe radioautographically the effects of TCA and EDTA on the secretory proteins of the serous pancreatic cells, on the seromucous submandibular gland cells and on the ultrastructure of these glands of mice sacrificed 1h after the injection of a single dose of ^3H -glycine by intracardiac fixation with 4% p-formaldehyde solution. The glands of each animal were divided in small fragments (about 1mm^3) which were separated in three groups: control (non treated), treated with TCA and treated with EDTA. The radioautographic reactions were quantified by counting the reduced silver grains over the secretion of the serous pancreatic and seromucous submandibular gland cells. The counting data, after statistical variance analysis, showed that both TCA and EDTA did not extract the labelled proteins of the acinar cells secretions of pancreas and submandibular glands. Although TCA removed the minerals faster than the EDTA it was more difficult to obtain ultra-thin and semi-thin sections in the gland fragments treated with it. Also the staining of the acinar cells with methylene blue was impaired.

The fragments treated by the EDTA did not present significant ultrastructural differences when compared with controls. The TCA, on the other hand, caused some damage to the fine structure of various cellular components. Therefore, its use as a decalcifier of hard tissues on ultrastructural studies should not be recommended.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - CORRÊA, A. C. F. and BLUMEN, G. Estudo da ação de descalcificadores sobre os tecidos na evidência histoquímica de grupos reativos de proteínas. Cienc. Cult., 26 (supl.): 272, 1974.
- 2 - FERRAZ CORRÊA, A.C. and MERZEL, J. Histochemical behaviour of polysaccharide methods on tissues submitted to decalcification. Acta Histochem. Bd., 25: 233-238, 1966.
- 3 - FISKE, C.H. and SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem., 66(2): 375-400, 1925.
- 4 - GLAUERT, A.M. and GLAUERT, R.H. Araldite as an embedding medium for electron microscopy. J. Biophys. biochem. Cytol., 4: 409, 1958.
- 5 - KOPRIWA, B.M. and LEBLOND, C.P. Improvements in the coating technique of radioautography. J. Histochem. Cytochem., 10: 269-272, 1962.
- 6 - LILLIE, R.D. Studies on the decalcification of bone. Amer. J. Pathol., 21: 291-296, 1944.
- 7 - LILLIE, R.D. Glycogen in decalcified tissue. J. Histochem. Cytochem., 10: 763-765, 1962.
- 8 - LILLIE, R.D.; LASKEY, A.; GRECO, J.; BURTNER, H. J. and JONES, P. Decalcification of bone in relation to staining and phosphatase technics. Am. J. Clin. Path., 21: 711-722, 1951.
- 9 - MARDEFIN, D.F. and JAMES, V.E. Effect of nitric acid and chelation demineralization on various stains of histochemical nature. J. Dental Res., 36: 759-764, 1957.
- 10 - PERACCHIA, C. and MITTLER, B.S. New glutaraldehyde fixation procedures. J. Ultrastructure Research, 39: 57-64, 1972.

- 11 - REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol., 17: 208, 1963.
- 12 - SCHMIDT, A.J. Localization of glycogen in decalcified tissues. J. Histochem. Cytochem., 11: 443, 1963.
- 13 - SCHAJOWICZ F. and CABRINI, H.L. The effect of acids (decalcifying solutions) and enzymes on the histochemical behaviour of bone and cartilage. J. Histochem. Cytochem., 3: 122-129, 1955.
- 14 - THORELL, B. and WILTON, A. The nucleotide metabolism of the dentin cells under normal conditions and in avitaminosis C. Acta path. et microbiol. Scandinav., 22: 593-602, 1945.
- 15 - TROTT, J.R. Localization of glycogen in the rat liver following in vitro processing in decalcifying agents. J. Histochem. Cytochem., 9: 699-702, 1961.
- 16 - TROTT, J. R.; GORENSTEIN, S.L.; PEIKOFF, M.D. A chemical and histochemical investigation of glycogen in rat liver and palate following treatment with various fixatives and EDTA. J. Histochem. Cytochem., 10: 245-249, 1962.
- 17 - WASHAWSKY, H. and MOORE, G. A technique for the fixation and decalcification of rat incisors for electron microscopy. J. Histochem. Cytochem., 15(9): 542-549, 1967.
- 18 - WISLOCKI, G. B. and SOGNAES, R.F. Histochemical reactions of normal teeth, Am. J. Anat., 87: 239-276, 1950.